

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32613

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08371

研究課題名（和文）先例のないフェノタイプを惹起する細胞周期阻害剤の創薬展開と作用機序解明

研究課題名（英文）Drug development of novel anti-mitotic agent with unique phenotype and elucidation of the mechanism of action

研究代表者

松野 研司（MATSUNO, Kenji）

工学院大学・先進工学部・教授

研究者番号：50433214

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：化合物1は、既存の細胞周期阻害剤とは全く異なる極めてユニークな細胞表現型（フェノタイプ）を示しアポトーシスを惹起したことから、未知の標的分子の機能を制御することが強く示唆された。そこで、化合物1の医薬化学研究による強活性化を図り、抗がん剤リード化合物へと進化させた。また、化合物1のプロープ分子を設計・合成し、標的分子を探索した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既存の細胞周期阻害剤とは全く異なる性質を有する化合物1の医薬化学研究により、抗がん剤リード化合物へと進化させた。また、化合物1のプロープ分子を設計・合成し、細胞内の標的分子を探索した。本研究成果により、細胞周期を標的とした新規抗がん剤研究開発における化学基盤を構築した。

研究成果の概要（英文）：Compound 1 suppressed cell cycle with unique phenotype to induce apoptosis. Analogue synthesis of compound 1 revealed the structure activity relationships (SARs), and provided enhanced potent analogues. Also, we designed and synthesized the probe molecule to identify the target molecule of compound 1 based on the SARs. Elucidation of the target molecule is on going.

研究分野：創薬化学

キーワード：抗がん剤 リード化合物 細胞周期 プロープ分子

1. 研究開始当初の背景

白血病治療薬イマチニブの登場以来、全世界的ながん患者数増大に呼応して多くの分子標的抗がん剤が研究開発されている。一方で、臨床現場では無効例や重篤な副作用も散見されることから、抗がん剤標的分子の拡充による新規作用機序の抗がん剤創出が重要である。

がん細胞は急速に細胞分裂を繰り返すことで増殖する。その細胞分裂では、DNA複製や染色体の分配などが整然と制御された細胞周期(→G1期→S期→G2期→M期→)と呼ばれる4つの段階を経ることで2つの娘細胞が生成する。その破綻はアポトーシス(細胞死)につながることから(図1)、細胞周期を標的とした創薬研究は多数実施されている。古典的には微小管重合を標的としたタキソールやビンカルカロイドが開発され、臨床でも一定の治療効果を収めている。近年では、染色体分離に重要な **kinesin spindle protein (KSP)** や **aurora kinase**、さらには細胞周期を制御する **cyclin-dependent kinase (CDK)** などの特異的に阻害する化合物が多数開発されている。このうち **CDK4/6** 阻害剤は、**CDK4/6** とサイクリン **D** の複合体を特異的に阻害することから、有望な標的分子と認識されており、**palbociclib** や **abemaciclib** が承認されている。しかし、タキソールやビンカルカロイドは重篤な神経障害が、**CDK4/6** 阻害剤では骨髄抑制作用や皮膚障害が副作用として問題である。これらの状況から、さらなる細胞周期を阻害する新規抗がん剤の創出が求められている。



図1. 細胞周期阻害とアポトーシス

2. 研究の目的

細胞周期を阻害し新規なフェノタイプを惹起する化合物を見出し、その誘導体合成・評価により構造活性相関を解明するとともに、抗がん剤リード化合物を創出する。また、構造活性相関を活用してプローブ分子を合理的に設計・合成し、ケミカルバイオロジー研究により標的分子を探索する基盤を構築する(図2)。

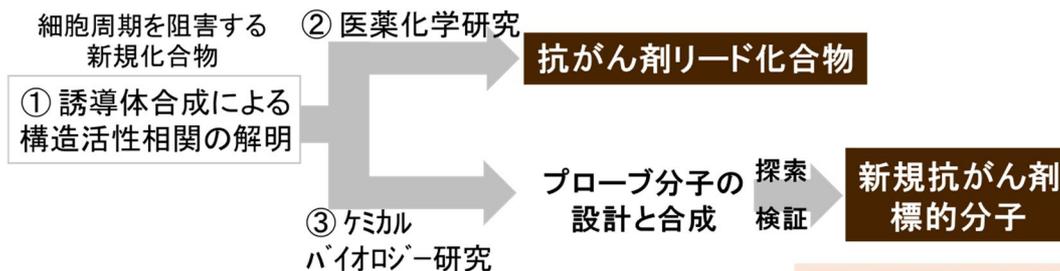


図2. 本研究の目的

3. 研究の方法

以下に示す方法で研究を実施した(図2)。

- 化合物ライブラリーをスクリーニングすることで、細胞周期進行を抑制するヒット化合物を見出す。
- 上記で見出したヒット化合物の誘導体を合成し、さらなる強活性化を図るとともに、構造活性相関を解明する。
- 構造活性相関情報をもとに **tag** 導入可能な箇所を同定し、標的分子探索を目的としたプローブ分子を合理的に設計・合成する。
- 構造活性相関情報をもとに誘導体合成を継続し、抗がん剤リード化合物となりうる化合物に進化させる。
- 合成したプローブ分子を活用し、ケミカルバイオロジー研究により細胞抽出液等から標的分子を探索する。

4. 研究成果

細胞周期進行を抑制する化合物を見出すべく、**HeLa** 細胞などの細胞株を用いて化合物ライブラリーをスクリーニングしたところ、化合物 **1** を見出した。その詳細を検討したところ、既存の細胞周期阻害剤とは全く異なるフェノタイプを示し、アポトーシスを惹起することが判明した。これらの結果から化合物 **1** (特許性があるため構造式は非開示) は未知の標的分子の機能を制御していることが強く示唆された。

そこで化合物 **1** の誘導体を合成した。具体的には図 **3** に示すように、

R¹ ~ R² を変換した化合物の合成と評価

新たな置換基 **R³** を導入した化合物の合成と評価

上記 および をハイブリッドした化合物の合成と評価を実施した。



図3. 誘導体合成による構造活性相関の解明

(1) 誘導体合成と構造活性相関の把握

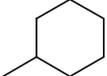
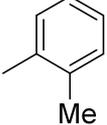
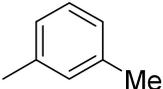
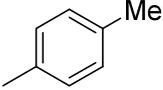
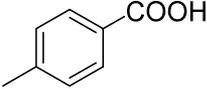
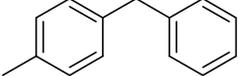
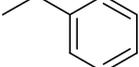
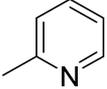
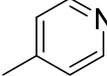
まず **R¹** を変換した化合物として、アルコキシ基、アルキル基、ハロゲン、アミノ基などを有する化合物を合成した(表1)。その結果、アルコキシ基では炭素鎖の伸長により活性が変動し、エトキシ基を有する化合物(**4**)の活性が強くなった。一方で、プロポキシ基以上の長さは許容されなかった。また、アルキル基やハロゲン、ジメチルアミノ基に変換した化合物はいずれも活性が消失した。

表1 **R¹** を変換した化合物の評価結果(一部抜粋)

化合物番号	R¹	IC₅₀ (μM)
1	OMe	3
2	H	>50
3	OH	>50
4	OEt	0.5
5	OnPr	30
6	OPh	>50
7	Me	>50
8	F	>50
9	Cl	>50
10	NMe₂	>50
11	piperidino	>50

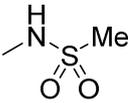
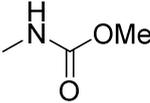
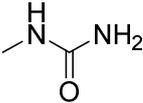
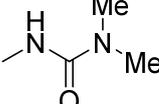
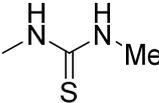
R² を変換した化合物として、アルキル基、シクロアルキル基、置換フェニル基、ベンジル基、ピリジル基などを有する化合物を合成した(表2)。その結果、メチル基(**12**)やシクロヘキシル基(**13**)を有する化合物の活性は消失した。また、フェニル基上に置換基を導入した化合物においては、置換位置により活性が変動することが明らかになった。メタ置換体(**15**)が最も強活性であり、パラ置換体(**16**)にも活性は認められたが、オルト置換体(**14**)の活性は消失した。置換基の種類に関しては、高い置換基の導入は活性を低下させた。さらに、フェニル基との間にメチレン鎖を挿入したベンジル体(**19**)は活性が消失した。フェニル基をピリジル基に変換した化合物(**20, 21**)も活性が消失した。

表2 R²を変換した化合物の評価結果（一部抜粋）

化合物番号	R ²	IC ₅₀ (μM)
12	Me	>50
13		>50
14		>50
15		1.7
16		10
17		>50
18		>50
19		>50
20		>50
21		>50

また、R³を導入した化合物を合成した結果、ニトロ基を有する化合物では活性が消失したが、アミドを有する化合物で良好な細胞周期阻害活性が認められた。そこで、スルホンアミド、カルバメート、ウレア、チオウレアに変換した化合物を合成したが、いずれも活性は低下した(表3)。

表3 R³を変換した化合物の評価結果（一部抜粋）

化合物番号	R ³	IC ₅₀ (μM)
22		>50
23		20
24		>50
25		>50
26		>50

以上の結果を受け、R¹~R³部分で最適と思われる置換基をハイブリッドした化合物を合成したところ、期待通りの活性向上に成功し、抗がん剤リード化合物の創製に成功した。なお誘導体合成に際しては、市販品として入手可能な試薬より常法によって実施した。また評価に関しては、conventionalなMTT法により細胞増殖阻害活性を評価した。

(2) プロープ分子の設計と合成、およびプロープ分子を活用した標的分子の探索

標的分子を探索するためのプロープ分子には、適切なタグを付与することが必要である。複数の候補が考えられる中で、本研究ではケミカルバイオロジー研究で広く活用されているビオチン化を検討することにした。ビオチンは、(ストレプト)アビジンとの間で極めて強力かつ特異的な結合を形成することが知られている。したがって、化合物1をビオチン化することにより、標的タンパク質を釣り上げるプロープ分子として機能することが期待される。

上述の誘導体合成・評価から解明した構造活性相関から、R²部分に嵩高い置換基を導入すると活性低下につながったことから、この位置へのビオチン化は不適と考えられた。一方でアミド基を有する化合物の活性が保持されたことから、この部分へのビオチン標識が妥当と考えられた。すなわち、アミド部分に適切なリンカーを介してビオチンを結合させたプロープ分子27を設計した。リンカーとしては、本領域で実績のある長鎖アルキル基とした。実際の合成に際し、ビオチンの導入は **biotin N-hydroxysuccinimide ester** を用いることで達成した。

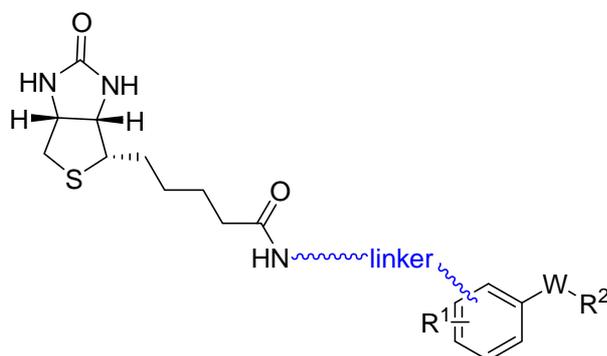


図4 . プロープ分子 27

次に、培養した細胞の抽出液を調製し、上記で合成したプロープ分子27をインキュベーションした後、ストレプトアビジンビーズで固定化した。その後、結合タンパク質を溶出したところ、標的分子と思われるタンパク質を捕捉することができた。現在、MALDI-TOFMSによる同定を検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Suzuki Yumiko, Sawada Jun-ichi, Hibner Paulina, Ishii Hirosuke, Matsuno Kenji, Sato Masayuki, Witulski Bernhard, Asai Akira	4. 巻 145
2. 論文標題 Fluorescent anticancer quinazolines as molecular probes for α -tubulin colchicine site competition assay and visualization of microtubules as intracellular targeting sites	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Dyes and Pigments	6. 最初と最後の頁 233 ~ 238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dyepig.2017.05.050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukuda Miwa, Sasaki Tomomi, Hashimoto Tomoko, Miyachi Hiroyuki, Waki Minoru, Asai Akira, Takikawa Osamu, Ohno Osamu, Matsuno Kenji	4. 巻 28
2. 論文標題 Cyclic analogue of S-benzylisothiurea that suppresses kynurenine production without inhibiting indoleamine 2,3-dioxygenase activity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 2846 ~ 2849
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2018.07.034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sawada Jun-ichi, Ishii Hirosuke, Matsuno Kenji, Sato Masayuki, Suzuki Yumiko, Asai Akira	4. 巻 96
2. 論文標題 Selective Inhibition of Spindle Microtubules by a Tubulin-Binding Quinazoline Derivative	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Pharmacology	6. 最初と最後の頁 609 ~ 618
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/mol.119.116624	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ohno Osamu, Terasaki Takuro, Sano Takuya, Hitomi Yuki, Miyamoto Junichiro, Matsuno Kenji	4. 巻 30
2. 論文標題 Inhibitory effects of biseokeaniamide A against lipopolysaccharide-induced signal transduction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 127069 ~ 127069
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2020.127069	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 澤田 潤一、石井 浩介、鈴木 由美子、松野 研司、浅井 章良
2. 発表標題 チュープリン結合性キナゾリン化合物の細胞周期M期阻害活性の解析
3. 学会等名 日本薬学会第139年会（千葉）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fukuda, M.; Sasaki, T.; Hashimoto, T.; Miyachi, H.; Waki, M.; Asai, A.; Takikawa, O.; Ohno, O.; Matsuno, K.
2. 発表標題 Elucidation of the mechanism of action for benzimidazole analogues as potent kynurenine production inhibitor.
3. 学会等名 EFMC-ACSMEDI MedChem Frontiers 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koide, T.; Watanabe, T.; Naganuma, M. Hashimoto, T.; Akaki, S.; Furuta, K.; Yamamoto, Y.; Nagashima, S.; Tokiwa, H.; Tanaka, S.; Ohno, O.; Matsuno, K.
2. 発表標題 Synthtic studies on GPR35 agonist without species-specificity
3. 学会等名 27th International Society of Heterocyclic Chemistry Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田美和、佐々木智未、中山寛太、橋本知子、宮地弘幸、脇稔、浅井章良、滝川修、大野修、松野研司
2. 発表標題 IDO阻害剤の合成研究：イソチオウレア構造の変換によるキヌレニン産生阻害剤の発見と作用機序解明
3. 学会等名 第37回メディシナルケミストリーシンポジウム（八王子）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤田 潤一、石井 浩介、鈴木 由美子、松野 研司、浅井 章良
2. 発表標題 チューブリン結合性キナゾリン化合物の細胞周期M期阻害活性の解析
3. 学会等名 日本薬学会第139年会 (千葉)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木由香、小野寺貴恵、松野研司、高村岳樹、井上謙吾、下山達、小泉史明、益谷美都子
2. 発表標題 細胞内にポリ(ADP-リボース)の蓄積を誘導する新規化合物MO2455とその誘導体が、がん細胞に与える影響
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ohno, O.; Nagaya, Y.; Ito, A. Iwasaki, A.; Suenaga, K.; Matsuno, K.
2. 発表標題 Isolation and functional analysis of novel compounds with selective cytotoxicity under glucose-restricted conditions.
3. 学会等名 International Congress on Pure & Applied Chemistry (ICPAC) Langkawi 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木由香、小野寺貴恵、小泉史明、松野研司、高村岳樹、下山達、井上謙吾、益谷美都子
2. 発表標題 Mechanistic study of cell death caused by a potential anticancer agent MO2455, which induces PAR accumulation.
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木由美子、澤田潤一、石井浩介、P. Hibner、松野研司、佐藤雅之、B. Witulski、浅井章良
2. 発表標題 蛍光団を内蔵する抗がん活性キナゾリンの分子プローブとしての利用
3. 学会等名 第47回複素環化学討論会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

工学院大学 先進工学部 生命化学科 医薬化学研究室 http://www.ns.kogakuin.ac.jp/~wwa1068/index.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大野 修 (OHNO Osamu) (20436992)	工学院大学・先進工学部・准教授 (32613)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------